

BENZODIAZEPINE DERIVATIVE

Patent Number: JP6211812
Publication date: 1994-08-02
Inventor(s): HAGISHITA YAMAJI; others: 04
Applicant(s): SHIONOGI & CO LTD
Requested Patent: ☐ JP6211812
Application Number: JP19930008120 19930121
Priority Number(s):
IPC Classification: C07D243/24
EC Classification:
Equivalents: JP3222599B2

Abstract

PURPOSE: To obtain a benzodiazepine derivative, having excellent selective antagonistic action on gastrin receptor and useful as a therapeutic agent for diseases related to the gastrin such as gastric ulcer without any side effects on the central nervous system.

CONSTITUTION: The compound of formula I {R<1> is carboxy or CHR<2>R<3>; R<2> and R<3> are H, alkoxy, amino, azide, OC(O)NH(CH₂)₃COOR<4>, SCH₂COOR<4> (R<4> is H or lower alkyl) or CONR<5>R<6> [R<5> and R<6> are H, (CH₂)₃(N-substituted) sulfamoylphenyl or, together with N to which both are bound, may form piperazine substituted with (CH₂)₅C(CH₃)₂OR<7> (R<7> is H or C(O)NH(CH₂)₃COOR<4>)]} or its addition salt, e.g. 1-(carboxymethyl)-3-(N'-(m-toyl)ureido)-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one. The compound is produced by using a benzodiazepine compound of formula II as a starting substance.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-211812

(43) 公開日 平成6年(1994)8月2日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 243/24				
// A 6 1 K 31/55	A C L			
	A E D	7431-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平5-8120

(22) 出願日 平成5年(1993)1月21日

(71) 出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 発明者 萩下 山治

奈良県御所市古瀬502番地

(72) 発明者 瀬野 薫

兵庫県西宮市樋ノ口町1-10-19

(72) 発明者 宮越 正宣

大阪府大阪市西淀川区柏里2-7-26 サ
ムティ塚本601号

(72) 発明者 津島 忠彦

大阪府池田市伏尾台1-18-13

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

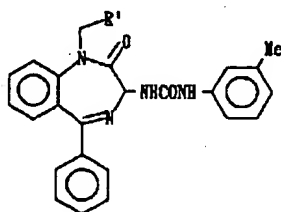
(54) 【発明の名称】 ベンゾジアゼピン誘導体

(57) 【要約】

【目的】 選択的なガストリン受容体拮抗剤を提供する。

【構成】 式 I :

【化1】



によって置換されたピペラジンを形成していてもよい。] で示されるベンゾジアゼピン誘導体またはその付加塩。

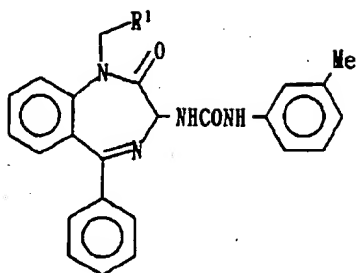
【効果】 中枢性副作用のない胃潰瘍等のガストリン関連疾患の治療剤として有用である。

【式中、 R^1 はカルボキシ、 CHR^2R^3 、但し、 R^2 及び R^3 は独立して水素、アルコキシ、アミノ、アジド、 $O C(O)NH(CH_2)_n$ 、 $COOR^4$ 、 SCH_2COOR^4 (R^4 は水素又は低級アルキル)、又は $CONR^5R^6$ 、但し、 R^5 及び R^6 は独立して水素、 $(CH_2)_n$ 、(N置換)スルファモイルフェニルを表すか、または、結合している窒素原子と一緒に、 $(CH_2)_n C(CH_3)_2 OR^7$ (R^7 は水素又は $C(O)NH(CH_2)_n COOR^4$)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式I:

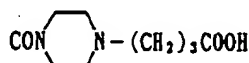
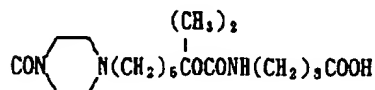
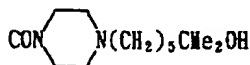
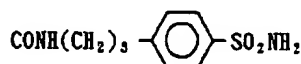
【化1】



【式中、R¹はカルボキシ、CHR²R³、但し、R²及びR³は独立して水素、アルコキシ、アミノ、アジド、OC(O)NH(CH₂)₆COOR⁴、SCH₂COOR⁴ (R⁴は水素又は低級アルキル)、又はCONR⁵R⁶、但し、R⁵及びR⁶は独立して水素、(CH₂)₆(N置換)スルファモイルフェニルを表すか、または、結合している窒素原子と一緒に、(CH₂)₆C(CH₃)₂OR⁷ (R⁷は水素又はC(O)NH(CH₂)₆COOR⁴) によって置換されたピペラジンを形成していてもよい。】で示されるベンゾジアゼピン誘導体またはその付加塩。

【請求項2】 R¹がカルボキシ；CHR²R³、ここにR²およびR³がエトキシであるか、またはいずれか一方が水素であって他がアミノ、アジド、OC(O)NH(CH₂)₆COOCH₃またはSCH₂COOR⁴ (R⁴は水素またはエチル)；またはCONR⁵R⁶、ここにR⁵またはR⁶の一方が水素であって、他が以下のいずれかの基：

【化2】



を表す)で示される請求項1のベンゾジアゼピン誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はガストリン受容体に対する選択的な拮抗薬として有用なベンゾジアゼピン誘導体に関する。

【0002】

【従来技術】 ガストリンはコレシストキニン (CCK) と共に、いわゆるガストリン群消化管ペプチドホルモンに属する。ガストリン受容体は、上部消化管全体、すい臓、肝臓および胆道系等にも存在するが、主に胃底腺壁細胞に存在し、胃酸分泌を調節している。一方CCK受容体は消化管など抹消に存在するもの (CCK-A受容体と呼ばれる) と、脳内に存在する中枢性のもの (CCK-B受容体と呼ばれる) との2種類が知られ、それぞれ消化管運動、膵液分泌および中枢作用、食欲等の調節に関与している。従って、これらの受容体に対する拮抗薬は、ヒトを含む様々な動物の胃腸および中枢神経系における、それぞれのペプチドホルモン関連疾患の治療、例えば抗腫瘍薬、あるいは肺炎、胆嚢治療薬、胆石発作の軽減、食欲改善、感応性腸症候群 (irritable Bowel Syndrome) 等の治療に有用と考えられている。また、消化管および中枢における受容体に関する研究から、これらのホルモンの生体活性物質としての重要性が明らかにされている (『脳とペプチド』代謝、Vol.18, No.10, 33-44 (1981) および特開昭63-238069号公報)。これらホルモンは、化学的に密接な関係にある。即ち、ガストリンとCCKペプチドとはC末端5アミノ酸残基が共通であり、ガストリン受容体とCCK受容体、特にCCK-B受容体との間には高い相同性が認められる。そのために、ガストリン受容体拮抗剤とCCK-B受容体拮抗剤との交差反応が問題となっている。例えば、胃腸潰瘍、ゾリンガー-エリソン症候群、洞C細胞過形成、およびガストリン活性低下等のガストリン関連疾患の治療にはガストリン受容体拮抗剤が有用と考えられるが、CCK-B受容体との交差反応のために中枢性副作用の恐れがあり、十分に治療目的を達成することが困難であった。

【0003】

【発明が解決すべき課題】 当然のことながら、ガストリン関連疾患の治療には、中枢性副作用を避けるためにガストリン受容体の特異的に拮抗する物質を用いることが望ましい。例えば胃潰瘍の治療におけるガストリン受容体-特異的拮抗剤の有用性が指摘されている (代謝29/七、1992等)。ガストリン受容体拮抗作用を有する抗胃潰瘍剤はすでに報告されているが (特開昭63-238069号公報等)、上記のように、CCK受容体との高い相同性により、ガストリン受容体のみに選択的に作用する物質は未だ知られていない。

【0004】

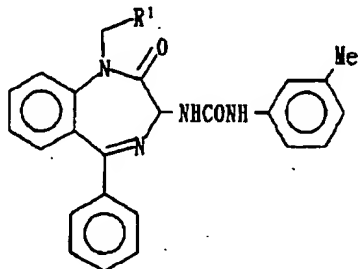
【課題を解決するための手段】 本発明者らはガストリン受容体を選択的に作用する拮抗剤を提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、ある種のベンゾジアゼピ

3

ン誘導体が優れた選択的ガストリン受容体拮抗作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち本発明は、式I：

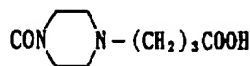
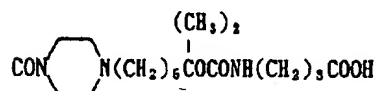
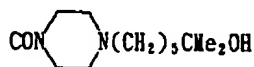
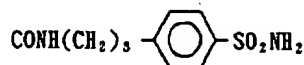
【化3】



【式中、R¹はカルボキシ、CHR²R³、但し、R²及びR³は独立して水素、アルコキシ、アミノ、アジド、OC(O)NH(CH₂)₃COOR⁴、SCH₂COOR⁴（R⁴は水素又は低級アルキル）、又はCONR⁵R⁶、但し、R⁵及びR⁶は独立して水素、(CH₂)₃（N置換）スルファモイルフェニルを表すか、または、結合している窒素原子と一緒に、(CH₂)₃C(CH₃)₂OR⁷（R⁷は水素又はC(O)NH(CH₂)₃COOR⁴）によって置換されたピペラジンを形成していてもよい。】で示されるベンゾジアゼピン誘導体またはその付加塩を提供するものである。

【0006】式Iの化合物の内、特に好ましいのは、R¹がカルボキシ；CHR²R³、ここにR²およびR³がエトキシであるか、またはいずれか一方が水素であって他がアミノ、アジド；OC(O)NH(CH₂)₃COOCH₃、またはSCH₂COOR⁴（R⁴は水素またはエチル）；またはCONR⁵R⁶、ここにR⁵またはR⁶の一方が水素であって、他が以下のいずれかの基：

【化4】



4

を表す）で示される化合物である。

【0007】上記式において、低級アルキルとは、C₁～C₆の直鎖または分枝鎖状の炭化水素基であって、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、t-ブチル等を指す。本発明のベンゾジアゼピンの付加塩とは、製薬上許容され得る塩を意味するが、好ましくは、塩酸塩、シュウ酸塩、スルホン酸塩等の有機酸塩である。本発明化合物Iは、当業者既知の任意の方法で製造することができる。例えば、後述する実施例および製造例には、ベンゾジアゼピン化合物（III-1；5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン）を出発物質とし、目的化合物の構造に応じて既知の反応を利用して製造する工程が記載されている。ただし、これらは特に好ましい製造方法および反応条件を示したものであって、当業者既知の他の方法で製造された式Iの化合物も本発明の範囲に包含される。本明細書記載の方法における出発物質（化合物III-1）は文献（The Journal of Organic Chemistry, 26, 4936 (1991)）記載の方法で製造することができる。

【0008】本発明化合物は式Iから明らかなように、光学活性な異性体としても存在する。しかしながら、後述する実験例に示すように、ラセミ体および光学活性な異性体は同様のガストリン受容体選択的拮抗作用を有し、いずれも本発明の目的の達成に有用である。従って、本明細書では主としてラセミ体に関して述べる。なお、特定の異性体は、ラセミ化合物を当業者既知の方法で光学分割するか、製造工程の出発物質または中間体を光学分割することにより、製造することができる。

【0009】例えば、式IにおいてR¹がカルボキシル基である光学活性体は、製造例1における中間体（化合物III-14）を光学分割して得られる光学活性な異性体（+III-14）を用いることにより、製造することができる（製造例2参照）。製造例2では、N-Boc-フェニルアラニンを用いて光学分割しているが、これに限らずアミンの光学分割に用いられる分割剤から任意に選択することができる。本発明化合物のCCK-B受容体に対する拮抗作用と、ガストリン受容体に対する拮抗作用とを比較したところ、IC₅₀値の比は約15～54と高く、これらの化合物が選択的ガストリン受容体拮抗剤であることが明らかになった。以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明する。

【0010】**製造例1** (2-ヒドロキシエチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン（化合物III-17）

【化5】

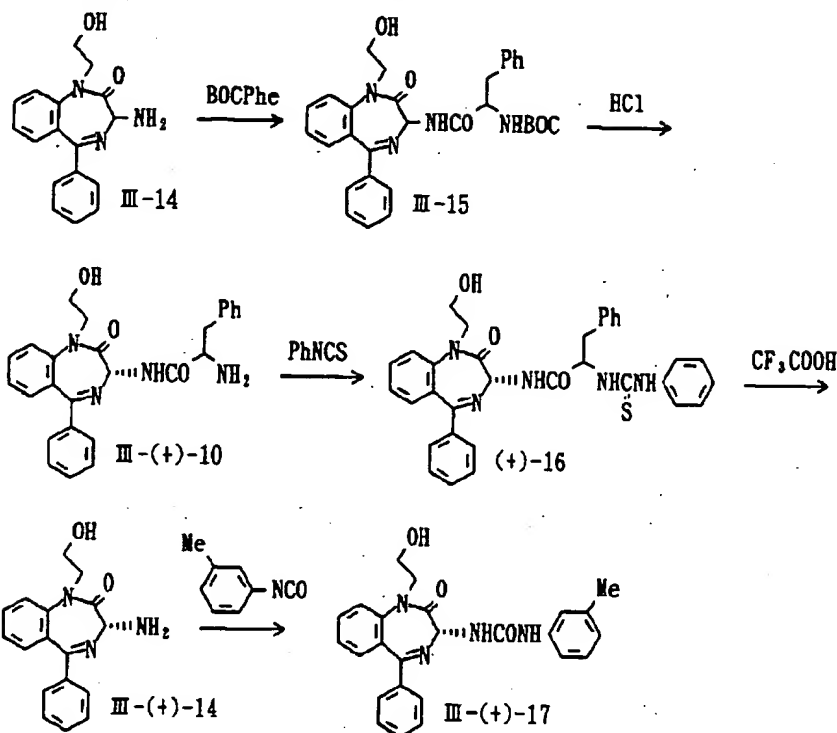
7

8

2:1、および酢酸エチル) にかける。

【0013】製造例2 1-(2-ヒドロキエチル)
-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル*

*ル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン
-2-オン (化合物(+)-III-17)
【化6】



(1) 1-(2-ヒドロキエチル)-3-(N-Boc-1-フェニルアラニルアミノ)-5-フェニル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-15)

製造例1(3)で製造した化合物とN-Boc-フェニルアラニンとのカップリング反応によってアミノ基を保護することにより、化合物(III-15)を得る。

【0014】(2) (3R, 2'S)-1-(2-ヒドロキエチル)-3-(N-(アニリノチオカルボニル)フェニルアラニルアミノ)-5-フェニル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物(+)-III-16)

上記化合物 III-15 を加水分解し、得られたアミン (化合物 III-10, 5.42 g)、フェニルイソチオシアナート (1.82 g) のジクロロメタン (20 ml) 中溶液を室温で30分間放置する。減圧下、揮発性成分を除去し残渣をシリカゲル (100 g) によるフラッシュクロマトグラフィー (酢酸エチル) にかけてチオウレア生成物 (収量7.45 g) を得る。

【0015】(3) (3R)-1-(2-ヒドロキエチル)-3-アミノ-5-フェニル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物

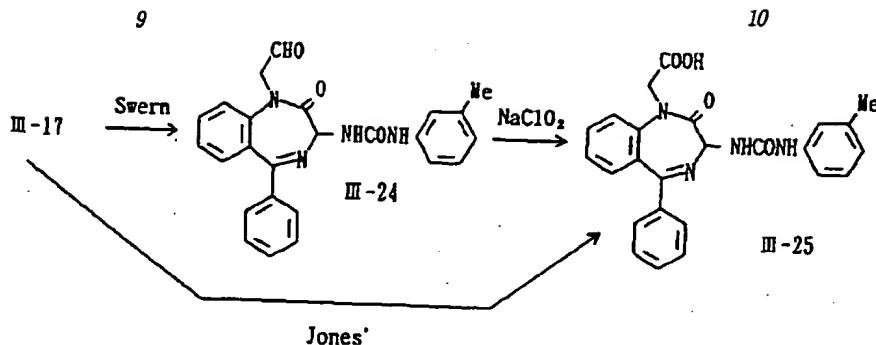
(+)-III-14)

トリフルオロ酢酸 (25 ml) 中のチオウレア ((+)-III-16, 4.75 g) 溶液を55℃で20分間攪拌し、減圧下、揮発性成分を除去する。酢酸エチルを加え、溶液を希塩酸で抽出し、抽出液を酢酸エチルで洗浄し、炭酸ナトリウム水溶液でアルカリ性にし、酢酸エチルで抽出する。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮し、アミン (1.32 g, 54.3%) を得る。このものを次工程に用いる。

(4) (3R)-1-(2-ヒドロキエチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物(+)-III-17)

上で得たアミン ((+)-III-14, 1.13 mg) を用い、製造例1(4)と同様に処理して、標題の光学活性体 ((+)-III-17) を得る。

【0016】実施例1 1-(カルボキシメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒロド-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-25)
【化7】



(1) 1-(ホルミルメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-24)

塩化オキザリル (0.23ml) のジクロロメタン (6ml) 溶液に -70℃ でジメチルスルホキシド (0.4ml) のジクロロメタン (1.3ml) 溶液を滴下する。混合物を -70℃ で 10 分間攪拌する。ジクロロメタン (15ml) 中アルコール化合物 (III-17, 0.9g) を滴下する。混合物を -70℃ で 1 時間攪拌する。トリエチルアミン (1.5ml) を加える。混合物を室温で 1 時間攪拌する。水を加える。有機相を分離し、水相をジクロロメタンで抽出する。有機相を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル (70g) によるフラッシュクロマトグラフィー (酢酸エチル) にかける。Rf 値の大きい画分をベンゼン-ヘキサンから結晶化させ、標題の化合物 63.5mg (64.4%) を得る。mp=135-137℃。Rf 値の小さい画分から出発物質 231mg が回収された (23.3%)。

【0017】(2) 1-(カルボキシメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-25)

水 (8.5ml) 中の塩化ナトリウム (850mg) およびりん酸二水素ナトリウム (850mg) の溶液をアルデヒド (III-24, 433mg) の t-ブタノール (27ml) および 2-メチル 2-ブテン (5ml) 中溶液に滴下する。混合物を室温で一晩攪拌し、減圧濃縮する。残渣を酢酸エチルに溶解する。混合物を 10% 炭酸ナトリウムで抽出し、濃塩酸で pH3 酸性にし、酢酸エチルで抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をメタノールから結晶化し、カルボン酸 (III-25, 736mg, 収率 82.

6%) を得る。mp=168-171℃。

【0018】[α]_D+3.7 (c1.135, CHCl₃)

IR ν_{max} (ヌジオール): 3340, 1655, 1604, 1555 cm⁻¹

NMR (CD₃OD) δ: 2.28 (3H, s), 4.55 (1H, d, J=20Hz), 4.65 (1H, d, J=20Hz), 5.47 (1H, s), 6.81 (1H, d, J=8Hz), 7.05-7.7 (12

20 H)

元素分析 (C₂₅H₂₂N₄O₂ · 2H₂O として)

実測値: C, 63.15; H, 5.15; N, 11.10

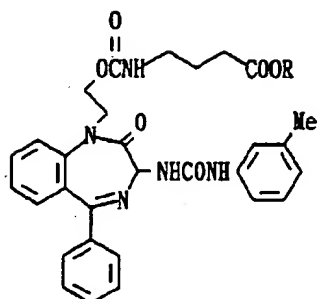
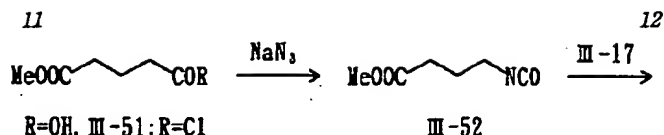
計算値: C, 62.75; H, 5.48; N, 11.71

【0019】(3) 別法として、アルコール (III-17, 747mg) のアセトン 10ml 中溶液に、氷冷下、ジョーンズ (Jones') 試薬 (3M, 1ml) を滴下する。混合物を室温で 30 分間攪拌する。ジョーンズ試薬 (0.5ml) を再度加える。混合物を室温で 20 分間攪拌する。水を加える。混合物を酢酸エチルで抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル (30g) によるフラッシュクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール-酢酸-水=90:10:1:1) にかける。標題の化合物 III-25 を得る。収量 541mg (収率 70.1%)。

30

【0020】実施例 2 1-(2-(3-(カルボメトキシ)プロピルカルバモイルオキシ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-53)

【化 8】



III-53: R=Me.

III-54: R=H

(1) 3-(カルボメトキシ)プロピルイソシアナート
(化合物III-52)

グルタル酸モノメチルエステル(22.0g)に塩化チオニル(22ml)を滴下する。室温で3時間溶液を攪拌する。過剰量の塩化チオニルを減圧下に留去し、残渣を105℃、17mmHgで蒸留し酸塩化物(22.38g)を得る。酸塩化物(22.38g)のアセトン(50ml)溶液をアジ化ナトリウム(10.6g)の水(70ml)中氷冷溶液に30分間で滴下する。混合物を0℃で1時間攪拌する。水を加え、混合物をベンゼン抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。溶液をゆっくりと加熱する。窒素ガスは約70℃で発生する。溶液を同じ温度で1時間加熱し、揮発性物質を常圧で留去する。残渣を22mmHgで95-97℃で蒸留し、無色油状物質(17.41g、ハーフエステルからの収率80.8%)を得る。

IR ν_{max} (フィルム) 2280 cm⁻¹

【0021】(2) 1-(2-(3-(カルボメトキシ)プロピルカルバモイルオキシ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-53)

乾燥ベンゼン(15ml)中のアルコール(化合物III-17、1.0g)、3-(メトキシカルボニル)プロピルイソシアナート(化合物III-52、0.83g)およびトリエチルアミン(0.5ml)溶液を20時間加熱還流する。固形物をろ過して集め、ベンゼンで洗浄し、乾燥する。母液を減圧濃縮する。残渣および固形

物を合し、シリカゲル(30g)によるフラッシュクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール;50:1)にかけ、酢酸エチルから結晶化し、カルバメート(1.33g、収率99.7%)を得る。mp=195-196℃。

【0022】IR ν_{max} (ヌジヨール): 3395、3320、1736、1718、1641、1614、1561 cm⁻¹

NMR (CDCl₃) δ: 1.61 (2H, m), 1.86 (1H, m), 2.24 (2H, t, J=8 Hz), 2.28 (3H, s), 2.75 (1H, m), 2.99 (1H, m), 3.67 (3H, s), 3.86 (2H, m), 4.20 (1H, m), 4.50 (1H, t, J=5 Hz), 4.77 (1H, m), 5.60 (1H, d, J=8 Hz), 6.84 (1H, t, J=4 Hz), 7.0-7.7 (12H)

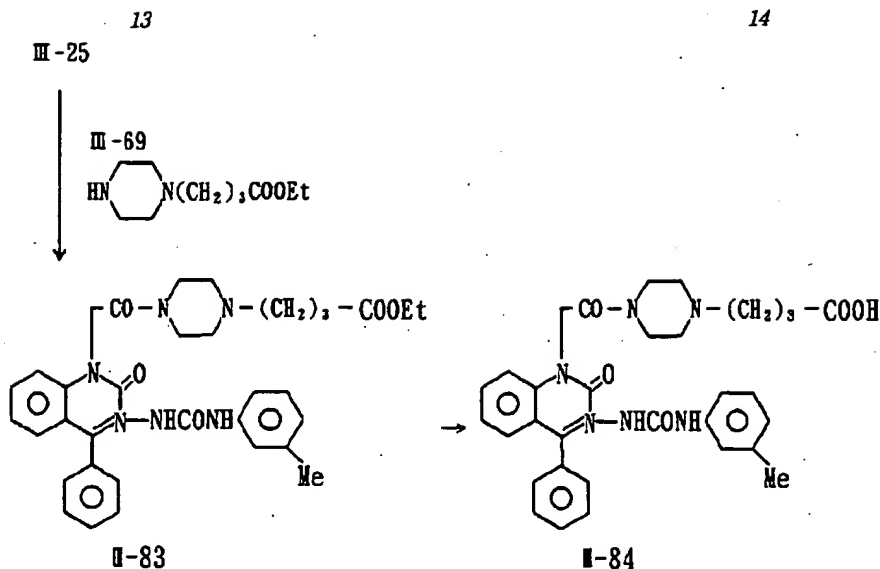
元素分析 (C₃₁H₃₃N₅O₆として)

実測値: C, 65.04; H, 5.91; N, 12.25

計算値: C, 65.14; H, 5.82; N, 12.25

【0023】実施例3 1-(3-(カルボキシ)プロピルピベラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-84)

【化9】



(1) 4-ピペラジノ酪酸エチル (化合物 III-69)

4-ブロモ-n-酪酸エチル (13.5 g)、ピペラジン二塩酸塩 (11.0 g) およびピペラジン六水和物 (13.42 g) のエタノール (70 ml) 中混合物を4時間加熱還流する。冷却後、固形物をろ過して集める。ろ液を減圧濃縮する。炭酸カリウム水溶液を加える。溶液をクロロホルム抽出する。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣を0.2 mmHg、105-106℃で蒸留し無色油状物質を得る (7.07 g, 51.0%)。

【0024】(2) 1-(3-(カルボエトキシ)プロピルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-83)

まず、化合物 III-69 を文献 (J. C. S. (1961年) 2404頁) に記載の方法に従って合成した。化合物 (III-69, 480 mg)、カルボン酸 (III-25, 883 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (461 mg) と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (54 mg) のジメチルホルムアミド (7 ml) 混合物に氷冷下トリエチルアミン (1 ml) を加える。混合物を二日間室温で攪拌した後40℃1 mmHgで留去する。残渣に水を加える。固体を濾過、水洗して乾燥した後、シリカゲル (50 g) を用いるクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール; 20:1) にかけて標記化合物 (III-8

3) 862 mg (70.5%) を得る。

NMR (CDCl₃) δ: 1.26 (3H, t, J=7 Hz), 1.77 (2H, m), 2.28 (3H, s), 2.2-2.4 (8H, br. s), 3.38 (2H, br. s), 3.53 (2H, br. s), 4.13 (2H, q, J=7 Hz), 4.66 (2H, s), 5.66 (1H, d, J=8 Hz), 6.8-7.7 (13H m)

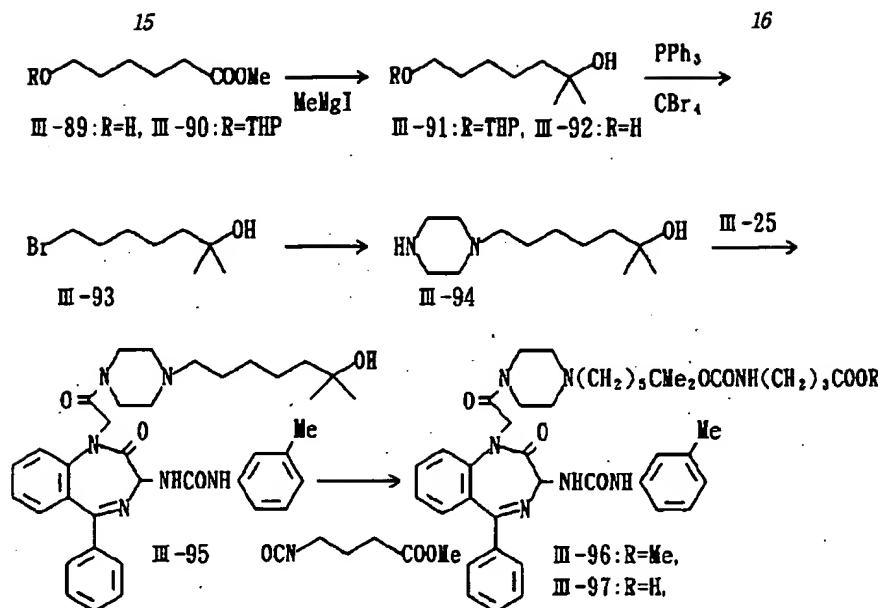
(+)-異性体: [α]_D +81.8 (c 1.090, CHCl₃)

【0025】(3) 1-(3-(カルボキシ)プロピルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-84)

上記エステル (化合物 III-83, 862 mg) のエタノール (10 ml) 溶液に炭酸カリウム水溶液 (10%, 3 ml) を加える。溶液を6時間加熱還流し減圧濃縮する。残渣に希塩酸を加える。固形物をろ過して集め、水洗し、乾燥してカルボン酸 (化合物 III-84, 669 mg, 79.7%) を得る。

【0026】実施例4 1-(6,6-ジメチル-6-(カルボキシ)プロピルカルバモイルオキシ)ヘキシルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-97)

【化10】



(1) 6-テトラヒドロピラニルオキシヘキシノ酸メチル (化合物 III-90)

ジクロロメタン (130ml) 中の 6-ヒドロキシヘキサノ酸メチル (III-89, 10.9g) およびデヒドロピラン (7.5ml) の溶液に p-トルエンスルホン酸 (235mg) を加える。溶液を室温で 3 時間攪拌し、炭酸水素ナトリウム水溶液に注加する。有機層を分離し、水層をジクロロメタンで抽出する。有機層を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮する。残渣を 25mmHg、130-131℃ で蒸留し、無色油状物質 10.16g (59.1%) を得る。

【0027】 (2) 1, 1-ジメチル-6-テトラヒドロピラニルオキシヘキサノール (化合物 III-91) 30
激しく攪拌しながらヨウ化メチル (7.0g) のエーテル (50ml) 溶液をマグネシウム (1.20g) に加える。添加完了後、混合物を 5 分間加熱還流し、冷却する。エーテル (30ml) 中エステル (III-90, 5.1g) を氷冷しながら滴下する。混合物を室温で 10 分間、還流温度で 30 分間攪拌する。冷混合物に塩化アンモニウムを滴下する。有機層を分離し、水層をエーテル抽出する。有機層を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。nmr は残渣に出発物質が混在していることを示し、これをエタノール 20ml 40
に溶解する。10% 水酸化ナトリウム (10ml) を加える。溶液を室温で 1 夜放置し、容量が半分になるまで濃縮する。水を加える。混合物をエーテル抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣を 115-120℃、0.2mmHg で蒸留し、無色油状物質 2.07g (40.1%) を得る。

【0028】 (3) 1, 1-ジメチルヘキサノ-1, 6-ジオール (化合物 III-92)

テトラヒドロピラニルオキシ化合物 (III-91, 2.10g) および p-トルエンスルホン酸 (0.05 50

g) のメタノール (20ml) 溶液を室温で 3 時間攪拌する。揮発性物質を減圧下に留去する。残渣をエーテルに溶解する。溶液を炭酸水素ナトリウム水溶液と水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣を 145-147℃、15mmHg で蒸留し、無色油状物質 1.1g (82.5%) を得る。

(4) 1, 1-ジメチル-6-ブromoヘキサノール (化合物 III-93)

テトラヒドロフラン (10ml) 中のトリフェニルホスフィン (1.96g) をジオール (化合物 III-92; 1.09g) および四臭化炭素 (2.47g) の乾燥テトラヒドロフラン (25ml) 中溶液に 0℃ で 1 時間を要して加える。混合物を室温で 7 時間攪拌する。不溶性物質をろ過し、エーテルで洗浄する。ろ液を減圧濃縮する。残渣をシリカゲル (30g) によるフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル; 4: 1) に付し、125-128℃ で蒸留し、臭化物 (0.945g, 60.0%) を得る。

【0029】 (5) 1, 1-ジメチル-6-ピペリラジノヘキサノール (化合物 III-94)

化合物 (III-93) を文献 (J. C. S. (1961 年), 2404) 記載の方法で化合物 (III-94) に変換した。

(6) 1-(6, 6-ジメチル-6-ヒドロキシヘキシルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-95)

上記の一般的な方法で化合物 III-25 と化合物 III-94 をカップリングさせ、標題の化合物を得る。

(7) 1-(6, 6-ジメチル-6-(3-(カルボメトキシ)プロピルカルバモイルオキシ)ヘキシルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレ

17

イド) -5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 I I I-96)

アルコール (I I I-95, 740mg)、ビス-(トリ-n-ブチル錫) オキシド (243mg) およびイソシアナート (I I I-52, 550mg) の乾燥テトラヒドロフラン (20ml) 中溶液を10時間加熱還流し、減圧濃縮する。残渣をクロロホルムに溶解する。溶液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル (50g) によるフラッシュクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール; 9:1) に付し、粘稠性の油状物質を定量的に得た。

IR ν_{max} (ヌジヨール) 3330、1727、1655、1613、1576 cm⁻¹

【0030】 (8) 1-(6, 6-ジメチル-6-(カルボキシ) プロピルカルバモイルオキシ) ヘキシルピペラジノカルボメチル)-3-(N'-(m-トリル) ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 I I I-97)

上記 (7) で得たエステル (1.03g) のメタノール (6ml) 溶液に10%水酸化カリウム水 (1.3ml) を加える。溶液を室温で24時間放置し、希塩酸で中和する。固形物をろ過して集め、水洗し、乾燥し、シリカゲル (30g) を用いるフラッシュクロマトグラフィー *

18

* (クロロホルム:メタノール; 4:1) にかける。ベンゼンを加え、揮発性物質を1mmHgで蒸留する。収量 343mg (収率35.9%)

IR ν_{max} (ヌジヨール) 3230、1660、1555 cm⁻¹

NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ: 1.32 (4H, m), 1.41 (6H, m), 1.55 (2H, m), 1.71 (2H, m), 1.78 (2H, quat, J=7Hz), 2.30 (3H, s), 2.42 (2H, t, J=7Hz), 2.56 (4H, m), 3.13 (2H, t, J=7Hz), 3.57 (2H, m), 3.64 (2H, m), 4.74 (2H, s), 5.60 (1H, s), 6.82 (1H, d, J=7Hz), 7.1-7.7 (11H, m)

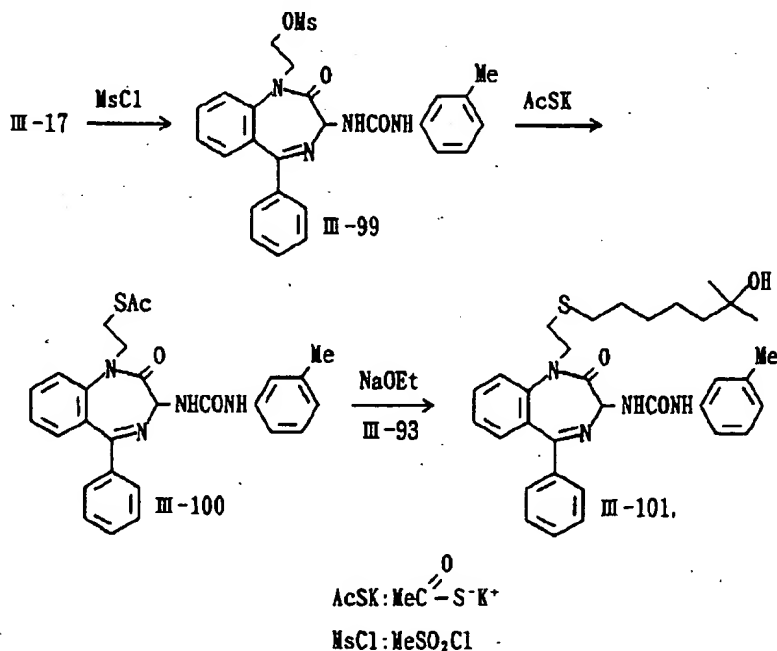
元素分析 (C₄₂H₅₃N₇O₇ · 1/6 C₆H₆として)

実測値: C, 66.13; H, 6.97; N, 11.72

計算値: C, 66.13; H, 6.97; N, 12.56

20 【0031】 実施例5 1-(2-(6, 6-ジメチル-6-ヒドロキシヘキシルチオ) エチル)-3-(N'-(m-トリル) ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 I I I-101)

【化11】



(1) 1-(2-アセチルチオ) エチル)-3-(N'-(m-トリル) ウレイド)-5-フェニル-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 I I I-100)

アルコール (I I I-17, 20.1mg) のジクロロメタ

ン (2ml) およびトリエチルアミン (1ml) 溶液に、-20℃でメタンスルホニルクロリド (70mg) のジクロロメタン (1ml) 溶液を滴下する。混合物を-20℃で30分間攪拌する。塩化アンモニウム水溶液を加える。有機層を分離し、水層をジクロロメタンで抽出する。有

19

機層を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮しメシレート(化合物III-99、223mg、93.8%)を得る。このメシレートとチオ酢酸カリウム(100mg)とのアセトニトリル(2ml)中混合物を窒素雰囲気下、2日間攪拌する。水を加える。混合物を酢酸エチルで抽出し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル(15g)を用いるフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル;1:1)にかけ、ベンゼンから結晶化させてチオアセテート170mg(収率79.4%)を得る。mp=198-200℃(rac. mp=174-175℃)。

【0032】(2)1-(2-(6,6-ジメチル-6-ヒドロキシヘキシルチオ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-101)

金属ナトリウム(0.10g)をエチルアルコール(3ml)中で加熱還流して溶解する。冷溶液に1-(2-(アセチルチオ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(III-100、473mg)を1度に加える。混合物を室温で3時間攪拌する。エタノール(2ml)中の臭化物(III-93、240mg)溶液を滴下する。混合物を室温で18時間攪拌する。水を加え、混合物をジクロロメタンで抽出する。溶液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル(25g)を用いるフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン;2:1)にかけ、チオエーテル203mg(収率36.5%)を得る。

20

*IR ν_{max} (ヌジオール): 3330, 1660, 1610, 1599, 1555 cm⁻¹

NMR (CDCl₃) δ: 1.21 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.2-1.51 (8H), 2.29 (3H, s), 2.38 (2H, m), 2.65 (2H, m), 3.84 (1H, m), 4.56 (1H, m), 5.57 (1H, d, J=8Hz), 6.8-7.7 (13H)

元素分析 (C₃₃H₄₅N₄O₃Sとして)

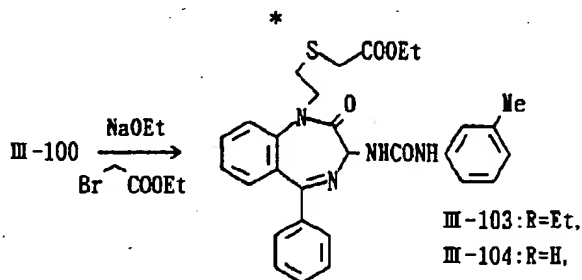
実測値: C, 69.16; H, 7.04; N, 10.10; S, 5.14

計算値: C, 69.20; H, 7.04; N, 9.78; S, 5.60

【0033】上記アルコール(III-101、198mg)、イソシアナート(III-52、100mg)およびトリエチルアミン(0.1ml)の乾燥トルエン(5ml)中溶液を40時間加熱還流する。減圧下に揮発性物質を留去する。残渣をシリカゲル(30g)を用いるフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル)にかけ、付加物1-(2-(6,6-ジメチル-6-(3-(カルボメトキシ)プロピルカルバモイルオキシ)ヘキシルチオ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(III-102)72mg(収率29.1%)を得る。

【0034】実施例6 1-(2-(カルボエトキシメチルチオ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-103)

【化12】



金属ナトリウム(66mg)をエチルアルコール(5ml)中で加熱還流して溶解する。冷溶液にチオエステル(III-100、303mg)を1度に加える。混合物を室温で3時間攪拌する。エタノール(2ml)中のプロモ酢酸エチル(180mg)溶液を滴下する。混合物を室温で6時間攪拌する。冷希塩酸を加え、溶液をジクロロメタンで抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル(15g)を用いるフラッシュクロマトグラフィー(トルエン:酢酸エチル;2:1)にかけ、トルエンから再結晶しエステル186mg(収率56.3%)を得る。mp=165-

40 167℃。

IR ν_{max} (ヌジオール): 3350, 1737, 1673, 1647, 1566 cm⁻¹

NMR (CDCl₃) δ: 1.21 (3H, t, J=t Hz), 1.63 (3H, s), 2.30 (3H, m), 2.73 (1H, m), 2.85 (1H, m), 2.95 (1H, d, J=15Hz), 3.10 (1H, d, J=15Hz), 3.90 (1H, m), 4.10 (2H, q, J=7Hz), 4.61 (1H, m), 5.56 (1H, d, J=8Hz), 6.7-6.9 (3H), 7.0-7.7 (10H)

21

元素分析 ($C_{27}H_{25}N_4O_4S$ として)

実測値: C, 65.85; H, 5.61; N, 10.64; S, 5.88

計算値: C, 65.64; H, 5.70; N, 10.56; S, 6.04

【0035】実施例7 1-(2-(カルボキシメチルチオ)エチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-104)

炭酸ナトリウム(85mg, 1.2ml)水溶液を前記エステル(III-103)(55, 322mg)のエタノール(7ml)中溶液に加える。混合物を5時間加熱還流する。希塩酸を加え、混合物を酢酸エチルで抽出する。抽出液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をベンゼン中で加熱し室温まで冷却する。固形物をろ別し、定量的に酸(III-104)を得る。
mp=130-131℃。

IR ν_{max} (ヌジオール): 3320, 1678, 1648, 1614, 1561 cm⁻¹

NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ: 2.31 (3H, s), 2.77 (1H, m), 2.88 (1H, m), 3.00 (1H, d, J=15Hz), 3.13 (1H, d, J=15Hz), 3.96 (1H, m), 4.63 (1H, m), 5.53 (1H, s), 6.83 (1H, d, J=6Hz), 7.1-7.7 (12H)

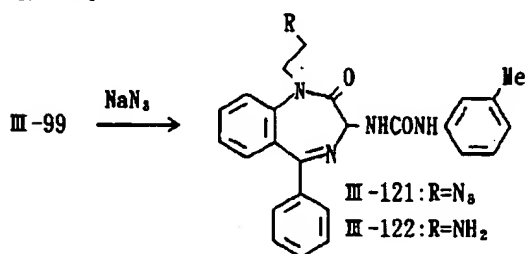
元素分析 ($C_{27}H_{25}N_4O_4S \cdot 1/2H_2O$ として)

実測値: C, 63.24; H, 5.14; N, 10.83; S, 6.00

計算値: C, 63.39; H, 5.32; N, 10.95; S, 6.27

【0036】実施例8 1-(2-アジドエチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-121)

【化13】



22

アルコール(III-17, 1.15g)から前記の方法で合成された粗メシレート(III-99)とアジ化ナトリウム(350mg)のヘキサメチルホスホリクトリアミド(7ml)中の混合物を50℃で3時間攪拌する。水に加えた後酢酸エチルで抽出する。抽出後を水洗いし、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して、標記化合物(III-121)を得る。

【0037】実施例9 1-(2-アミノエチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-122)

上記のアジド化合物(III-121)のテトラヒドロフラン(25ml)の溶液にトリフェニルホスフィン(1.0g)を入れ室温に一夜放置する。水(10ml)を加え30分間過熱還流した後、溶媒を減圧下に留去する。残渣を酢酸エチルで抽出する。抽出液を水洗いし、硫酸ナトリウムで乾燥して濃縮する。残渣をシリカゲル(30g)クロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール; 5:1)にかけ、アミン832g(III-17からの収率72.5%)を得る。mp=140-142℃。

IR ν_{max} (ヌジオール): 3320, 1680, 1645, 1615, 1563 cm⁻¹

NMR (CDCl₃) δ: 1.72 (4H, br. s), 2.28 (3H, s), 2.80 (2H, m), 3.75 (1H, m), 4.36 (1H, m), 5.55 (1H, d, J=8Hz), 6.83 (1H, m), 6.9-7.7 (13H, m)

元素分析 ($C_{25}H_{25}N_5O_2 \cdot 0.8H_2O$ として)

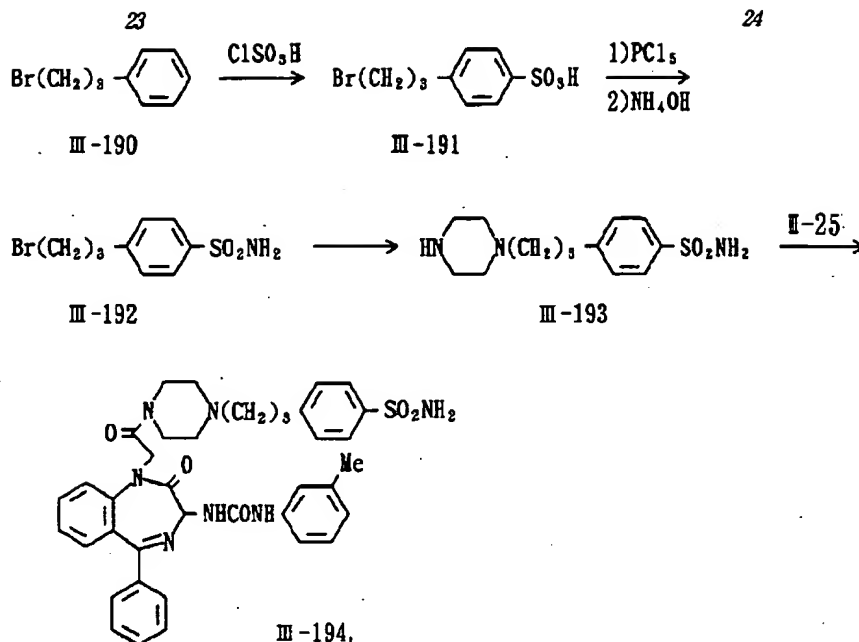
30 実測値: C, 67.96; H, 6.02; N, 15.91

計算値: C, 67.95; H, 6.07; N, 15.85

【0038】実施例10 1-(3-(4-スルファモイルフェニル)プロピルピペラジノ)カルボメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン(化合物III-194)

【化14】

40



(1) 4-(3-ブロモプロピル)フェニルスルホンアミド (化合物 III-192)

クロロホルム (50 ml) 中の 3-フェニルプロピルブロミド (10.85 g) 溶液をクロロホルム (50 ml) 中のクロロスルホン酸 (18 ml) 溶液に、3℃で1時間を要して滴下する。混合物を室温で1時間攪拌し、1時間加熱還流する。冷却後、混合物を氷水に注ぎ入れる。有機層を分離し、水層をクロロホルムで抽出する。有機層を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣と五塩化りん (22.7 g) との混合物を 80℃で3時間加熱する。冷却後、混合物をクロロホルムで希釈し、氷水に注ぎ入れる。有機層を分離し、水層をクロロホルムで抽出する。有機層を合し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をテトラヒドロフラン (100 ml) に入れ、これに氷冷下、攪拌しながら1時間をかけて28%アンモニア水溶液 (200 ml) を滴下する。混合物を室温で3時間攪拌する。混合物を酢酸エチルで抽出する。抽出物を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をシリカゲル (70 g) を用いるフラッシュクロマトグラフィー (酢酸エチル：ヘキサン；1：1) にかき、ベンゼン-ヘキサンから結晶化させ、化合物 III-192 (8.40

6.6 g；3-フェニルプロピルブロミドからの収率 57.4%) を得る。

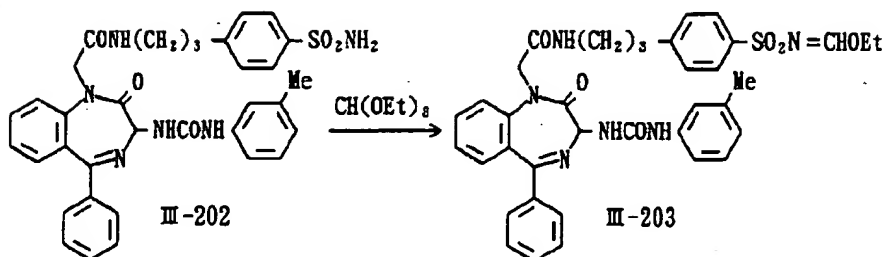
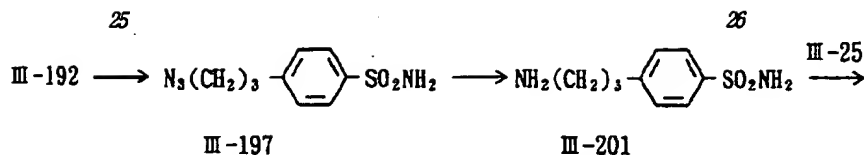
【0039】 (2) p-(3-ピペラジノプロピル)フェニルスルホンアミド (化合物 III-193)
実施例 4 (4) に記載の化合物 (III-94) と同様に、文献 (J. C. S. (1961年)、2404) に記載の方法で化合物 (III-192) を変換した。

(3) 1-(3-(4-スルファモイルフェニル)プロピル)ピペラジノカルボメチル-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-194)

既述の方法で化合物 (III-191) および化合物 (III-25) をカップリングさせて標題の化合物を収率 41.3% で得る。

【0040】 実施例 11 1-(3-(4-(エトキシメチレンスルファモイル)フェニル)プロピル)カルボメチル-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物 III-203)

【化15】



(1) 4-(3-アジドプロピル)フェニルスルホンアミド (化合物III-197)

臭化物 (III-192, 2.00 g) およびアジ化ナトリウム (1.0 g) のヘキサメチルホスホリクトリアミド (10 ml) 溶液を室温で1夜攪拌し、水中に注ぎ入れ、エーテル抽出する。抽出物を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮する。残渣をベンゼン-ヘキサンから結晶化させる。この生成物には少量のHMPAが残存する。

【0041】(2) p-(3-アミノプロピル)ベンゼンスルホンアミド (化合物III-201)

アジド (III-197; 1.23 g) の乾燥テトラヒドロフラン (20 ml) 溶液にトリフェニルホフィン (1.47 g) を加える。溶液を室温で6時間放置する。水 (10 ml) を加え、溶液を30分間加熱還流し、減圧下、容量が半分になるまで濃縮する。クロロホルムを加え、固形物をろ別し、水およびクロロホルムで洗浄し、乾燥してアミン (0.65 g) を得る。mp=140-141℃。

【0042】(3) 1-(3-(4-スルファモイルフェニル)プロピルカルバモイルメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物III-202)

上記の方法でカルボン酸 (III-25) とアミン (III-201) とをカップリングさせて標題の化合物を収率78.6%で得た。

(4) 1-(3-(4-(エトキシメチレンスルファモイル)フェニル)プロピルカルバモイルメチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物III-203)

スルホンアミド (III-202, 0.71 g)、トリエチルオルトホルマート (1.7 g) および少量のp-トルエンスルホン酸の混合物を120℃で6時間加熱する。固形物をろ別し、エタノールで洗浄し、乾燥して標

題の化合物III-203 (574 mg, 収率76.1%) を得る。mp=197-199℃。

IR ν_{max} (ヌジヨール): 3320, 3235, 1693, 1670, 1644, 1600, 1543, 1160 cm⁻¹

NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ: 1.34 (3H, t, J=7 Hz), 1.79 (2H, quat, J=7 Hz), 2.30 (3H, s), 2.66 (2H, t, J=8 Hz), 3.26 (2H, m), 4.31 (2H, q, J=7 Hz), 4.34 (1H, d, J=16 Hz), 4.66 (1H, d, J=16 Hz), 5.59 (1H, s), 6.83 (1H, d, J=7 Hz), 7.1-7.7 (10H), 7.76 (2H, d, J=8 Hz), 8.39 (1H, s)

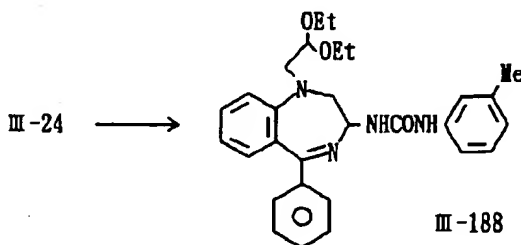
元素分析 (C₃₇H₃₇N₅O₆S·H₂Oとして)

実測値: C, 63.80; H, 5.55; N, 12.01; S, 4.55

計算値: C, 63.78; H, 5.79; N, 12.06; S, 4.60

【0043】実施例12 1-(2,2-ジエトキシエチル)-3-(N'-(m-トリル)ウレイド)-5-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン (化合物III-188)

【化16】



III-24 (150 mg) とp-トルエンスルホン酸 (1 mg) のエタノール (5 ml) 溶液を18時間過熱還流する。炭酸水素ナトリウム水溶液に入れる固体を濾過して集め、乾燥後シリカゲル (10 g) クロマトグラ

27

フィー（ヘキサン：酢酸エチル；1：1）にかけ、標記化合物を得る。mp=215-216℃

NMR (CDCl₃) δ: 0.95 (3H, t, J=7 Hz), 1.08 (3H, t, J=7 Hz), 2.30 (3H, s), 3.3-3.7 (4H, m), 3.84 (1H, dd, J=5, 14 Hz), 4.23 (1H, dd, J=5, 14 Hz), 4.76 (1H, t, J=5 Hz), 5.59 (1H, d, J=8 Hz), 6.8-7.1 (13H, m)

元素分析 (C₂₉H₃₂N₄O₄として)

実測値: C, 68.95; H, 6.30; N, 11.07

計算値: C, 69.58; H, 6.44; N, 11.19

【0044】上記実施例で製造した化合物の薬理効果を、モルモット胃粘膜を用いたガストリン受容体に対する拮抗作用、およびマウス的大脑皮質および脾臓を用いたCCK-BおよびCCK-A受容体に対する拮抗作用の3項目に関し、インビトロで検討した。

【0045】実験動物：雄性Sprague Dawley系ラット（体重220~270g）、雄性Hartley系モルモット（体重450~600g）あるいは雄性ddYマウス（体重24~30g）を用いた。

【0046】

(1) インビトロガストリン受容体拮抗作用

胃腺の調製:

1. 雄性Hartley系モルモット（体重450~600g; 3匹）を脱血屠殺後、直ちに胃を取り出し、大弯部を切開し内容物を冷水中にて洗浄する。

2. クレブス (Krebs) 液（氷冷）で洗浄後、1M NaCl（氷冷）を浸した脱脂綿で粘液を軽くふき取り、クレブス液で洗浄する。

3. クレブス液を浸した脱脂綿で粘膜面を軽くふき、スライドグラスを用いて粘膜を剥離し、0.1% BSAを含むハンクの (Hank's) 液に加え洗浄する。

4. 剥離粘膜に0.1%コラゲナーゼ液を加え37℃で20分間、間歇的に軽く振盪しながらインキュベーションする。上清をデカンテーションし、新たに0.1%コラゲナーゼ液を加え、さらに20分間インキュベーションする。

5. 20mlの注射筒を用いて吸引排出を3~4回繰り返す、細胞を分離し（単離細胞にはならず、5~10個が接着した胃腺である）、濾過（200ナイロンメッシュ）する。

Total	[125I] Gastrin	10 μl
Bound (Bo)	50% DMSO	10 μl
(3 Tubes)	10 ⁵ /ml Cell	230 μl

Non Specific [125I] Gastrin 10 μl

28

【0047】6. 270×g (1000rpm) で3分間遠心後上清を捨て、0.2% 中性プロテアーゼ (EC 3.4.24.4) 液を加え、駒込ピペットで数回ピペッティングして混合後、37℃で15分間インキュベーションする。

7. 270×g (1000rpm) で3分間遠心後上清を捨て、インキュベーション培地を加え、同様にピペッティングして細胞を洗浄する。3回繰り返す。以上の操作は、全て95%CO₂-5%O₂通気下で行う。

10 8. 生細胞数をトーマ (Thoma) 計算板によりカウントする。細胞液50μlに等量の0.4%トリパンブルー (trypan blue) を加え、軽く振盪して死細胞を染色後、中区画5個の生細胞数をカウントする（中区画仕切りの3本線内は数えない）。カウント数×10⁵/mlとなるので、インキュベーション培地で10⁵細胞/mlに希釈し、密閉して使用時まで氷冷しておく。

【0048】置換アッセイ (Displacement Assay):

a) 被験化合物の調製: 20mlのガラスバイアル瓶にそれぞれ約2mgを秤量し、DMSO液に溶解し、1mM濃度を作成する。次いでチューブを用い、50%DMSO液にて250μM（最終濃度10μM）を希釈作成する。さらに1/10濃度毎に25nM（最終濃度1nM）まで希釈作成する。

被験化合物濃度, nM

25	(1)
250	(10)
2500	(100)
25000	(1000)

(): 最終濃度, nM

【0049】b) 標識化合物の調製

5 nM（最終濃度 0.2 nM）の [125I] ガストリンを作成する。

計算例: 比活性 2000 Ci/μmol (100μCi/μl)

100μCi/μl × μmol/2000μCi = 0.05μmol/μl = 50nM

50nM / 5nM = 10

使用時、インキュベーション培地にて10倍希釈する。

【0050】c) コールドガストリン I (Cold Gastrin I) の調製

ヒトガストリン I をインキュベーション培地にて使用時希釈し、50μM（最終濃度2μM）濃度を作成する。

【0051】d) 下記の条件にてインキュベーションを行う。

Bound (NS)	Cold Gastrin	10 μ l
(2 Tube)	105/ ml Cell	230 μ l
被験化合物	[125I] Gastrin	10 μ l
Total Bound	被験化合物希釈液	10 μ l
(各点1 Tube)	105/ ml Cell	230 μ l

細胞の添加により反応を開始する。25℃で30分間インキュベーションした後、3000rpmで5分間遠心し、上清を吸引除去する。氷冷したインキュベーション増地0.5mlを加え、軽く混和後、直ちに遠心して上清を吸引除去する。放射能をガンマーカウンターにより計測する。

【0052】c) IC₅₀の算出:

IC₅₀: 被験化合物の特異的な結合 (Total, cpm - NS, cpm) を算出して求めた。

【0053】

(2) インビトロCCK-A及び-B受容体拮抗作用
CCK受容体標品の作製: 雄性ddYマウス(体重24~30g)を断頭屠殺後、大脳皮質(CCK-B)及び膵臓(CCK-A)を速やかに摘出した。

受容体標本(粗膜分画)の調製:

1. マウスを断頭屠殺し、直ちに大脳及び膵臓を取り出し、あらかじめ冷却しておいたPBS液で洗浄し、大脳は皮質を分離する。
2. 大脳皮質及び膵臓は洗浄バッファー(washed buffer; pH7.4、冷却)で再度洗浄する。
3. それぞれを1.5~2.0g/vialに秤量し、-80℃に保存する(2カ月安定)。

CCK-B Assay用, nM	CCK-A Assay用, μ M
被験化合物	被験化合物
25(1)	2.5(0.1)
250(10)	25(1)
2500(100)	250(10)
25000(1000)	

(): 最終濃度

【0056】b) 標識化合物の調製: 50nM(最終濃度1nM)の[3H]CCK-8を作成する。

計算例: 比活性 60 μ Ci/nmol (100 μ Ci/ml)

240 μ Ci/ml \times nmol/50 μ Ci = 4nmol/ml = 4000nM

4000nM / 50nM = 80

使用時、インキュベーションバッファーにて80倍希釈

Total	[3H] CCK-8	10 μ l
Bound (Bo)	50% DMSO	20 μ l
(3 Tube)	受容体標本	470 μ l
Non Specific	[3H] CCK-8	10 μ l
Bound (NS)	Cold CCK-8	20 μ l
(2 Tube)	受容体標本	470 μ l
被験化合物	[3H] CCK-8	10 μ l
Total Bound	被験化合物希釈液	20 μ l
(各点1 Tube)	受容体標本	470 μ l

* 【0054】4. 10倍量の洗浄バッファーを加え、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズ(7ストローク)し、さらにポリトロンホモジナイザーにて20秒間ホモジナイズする。

5. 15分間40,000 \times g(サーバル、15,800rpm)にて遠心し、ペレットを得る。

6. 10倍量の洗浄バッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーにて20秒間ホモジナイズし、同様に遠心し、ペレットを得る(2回繰り返す、蛋白量を測定する)。

7. 10倍量のインキュベーションバッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーにて20秒間ホモジナイズ後、同バッファーにて大脳皮質は最終的に40倍、膵臓は200倍希釈し、それぞれCCK-B及びCCK-A受容体標本とする。

【0055】置換アッセイ:

a) 被験化合物の調製

20mlのガラスバイアル瓶にそれぞれ約2mgを秤量し、DMSO液に溶解し1mM濃度を作成する。次いでチューブを用い、50%DMSO液にて250 μ M(最終濃度10 μ M)を希釈作成する。更に、1/10濃度毎に25nM(最終濃度1nM)まで希釈作成する。

する。





【0057】c) コールドCCK-8の調製: 883-Sをインキュベーションバッファーにて使用時希釈し、25 μ M(最終濃度1 μ M)濃度を作成する。

40 【0058】d) 下記の条件にてインキュベーションを行う。

受容体標本の添加により反応を開始する。25℃で90分間インキュベーションした後、吸引濾過し (Whatman glass microfilter, GF/C)、冷却した洗浄バッファにて3回洗浄する。5 mlのアクアソル-3 カクテル (aquasol-3 cocktail) を加え、蛍光検数時間放置し、放射能を5分間計数する。
[0059] c) IC50

IC50: 被験化合物の特異的な結合 (Total, dpm-N S, dpm) を算出した。結果を下記表1に示す。表中、B/G比は、ガストリン受容体に対する拮抗作用とCCK-B受容体に対する拮抗作用の比であって、被験化合物のガストリン受容体特異性を表す。

[表1]

実施例 番号	化合物 番号	R	立 体 異性体	受 容 体 IC ₅₀ , nM			B/G ratio
				Castrin	CCK-B	CCK-A	
1	III-25	-COOH	R	28	1500	65	53.6
10	III-194	-CONH(CH ₂) ₃ -  -SO ₂ NH ₂	RS	16	840	4600	52.5
11	III-203	-CONH(CH ₂) ₃ -  -SO ₂ N=CHOC ₂ H ₅	RS	19	610	3400	32.1
5	III-101	-CO-N  -(CH ₂) ₃ C(CH ₃) ₂ OH	RS	3	45	>10000	15
4	III-97	-CO-N  -(CH ₂) ₃ COCOCNH(CH ₂) ₃ COOH (CH ₃) ₂	RS	5	220	>10000	44
12	III-188	-CH(OC ₂ H ₅) ₂	R	2	83	3400	41.5
2	III-53	-CH ₂ OCOCNH(CH ₂) ₃ COOCH ₃	RS	18	235	2900	13.1
7	III-104	-CH ₂ SCH ₂ COOH	RS	52	1000	320	19.2
6	III-103	-CH ₂ SCH ₂ COOC ₂ H ₅	RS	6	110	1850	18.3
8	III-121	-CH ₂ N ₃	RS	1	24	360	24
9	III-122	-CH ₂ NH ₂	RS	26	800	8200	30.8

フロントページの続き

(72)発明者 石原 安信

京都府京都市南区西九条針小路町61